6 (1): 45–56 BONPLANDIA 1987

ESTUDIOS EMBRIOLOGICOS Y CITOLOGICOS EN LA YERBA MATE *ILEX PARAGUARIENSIS (AQUIFOLIACEAE)**

por CESAR OTTO NIKLAS**

Summary

The chromosome counts of *Ilex paraguariensis* St. Hil. confirmed the number 2n=40 for all the material studied. In the analysis of the meiosis it was proved that it has a normal behaviour, presenting 20 II. In the pollen analyzed about 100% of fertility was found. It was established that the embryo sac is of the Polygonum type. When the fruit is ripe, the embryos are in different stages: globular 2,6%; heart 70,24%; post heart 23,3%; torpedo 2,62% and mature 0,96%. These embryos continue growing when the seed is on conditions to germinate, this is the reason of the slow development observed in the germination.

Introducción

La Yerba Mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. *(Aquifoliaceae)* es una especie originaria de América del Sur, específicamente de la provincia botánica Paranaense, que abarca parte de las provincias de Misiones y Corrientes en la República Argentina, continuando por el sur de Brasil y parte del Paraguay, más precisamente

* Parte del trabajo final de graduación en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, realizado en el Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE–CONICET) Corrientes, Argentina.

** Becario de la Cooperadora del INTA, EERA Misiones. CC N• 4; 3384 Montecarlo, Misiones, Argentina.

entre los 18° y 30° de latitud sur y los meridianos 47° y 58° (Cabrera, 1976).

Los primeros cultivos fueron realizados por los Jesuítas a comienzos del siglo XVII. En 1896, Neumann en Colonia Nueva Germania (Paraguay) logra la germinación de las semillas, efectuando plantaciones, y en 1903 se realiza la primera plantación racional e importante en San Ignacio, Misiones, Argentina (Brieux *et al.*, 1982). Desde ese momento y hasta el presente la superficie plantada se ha ido incrementando, hasta alcanzar 140.000 ha. en la Argentina (Prat Kricum, 1983).

Hu (1975) estableció que once especies de *Ilex* del Hemisferio Norte, presentan embriones en estado rudimentario y por lo tanto una lenta germinación. Ferreira y Hu (1984) determinan la presencia de embriones rudimentarios en *Ilex paraguariensis*. Esta especie presenta problemas en la germinación de las semillas (Iritani *et al.*, 1981). En los ensayos de germinación realizados en el INTA de Cerro Azul, se determinó un 48% de semillas germinadas, además se destaca que la germinación no es uniforme (Prat Kricum *et al.*, 1985).

Con el objeto de esclarecer las causas de los problemas señalados, se realizaron estudios cromosómicos y del desarrollo del saco embrionario. Además se determinó el estado de los embriones en frutos maduros.

Materiales y métodos

Se usaron los clones CA–1/74; CA–6/74; CA–8/74; CA–47/75; CA–50/75 y la progenie del clon CA–30/75 provenientes del INTA de Cerro Azul. Además se emplearon semillas provenientes de cuatro plantas de un cultivo ubicado en Aristóbulo del Valle, km 224, del departamento Cainguás, Misiones, y una planta silvestre que crece en un monte en la misma localidad, que fue herborizada y determinada como *Ilex paragua-*

riensis St. Hil. por G. Giberti y depositada en el herbario del IBONE (CTES).

Para realizar los estudios mitóticos se utilizaron raicillas provenientes de semillas en germinación o de plantines. Las raicillas se pretrataron con una solución de 8–oxiquinoleína 0,002 M y fueron fijadas en alcohol absoluto–ácido láctico (5:1) (Fernández, 1973) manteniéndose luego en alcohol 70°, en refrigerador. Para la coloración se usó la técnica de Feulgen, triturando luego el material en una gota de orceína lacto–acética.

Para el estudio de la meiosis, se utilizó material proveniente del cultivo mencionado y del clon CA–50/75. Los botones florales masculinos fueron fijados en alcohol absoluto–ácido láctico (5:1) y fueron conservados en alcohol 70° en refrigerador. Para la coloración se utilizó el método de Feulgen, triturando luego las anteras en una gota de orceína lacto–acética.

Para la estimación de la fertilidad del polen se usó el método de coloración con carmín–glicerina, considerando como fértiles los granos totalmente coloreados.

Para el estudio del desarrollo del saco embrionario, se procedió a fijar botones florales femeninos en alcohol 70°. Se realizó la deshidratación en una serie de alcohol butírico terciario (ABT) y posterior imbibición en parafina. Los cortes fueron realizados con 10 a 15 micras de espesor. La coloración se hizo por el método de la doble tinción con safranina y fast–green.

Para la determinación del estado de desarrollo de los embriones, se procedió a desmenuzar los frutos maduros y se los sometió a reiterados lavados con agua para separar los pirenos del resto del fruto. Se desecharon todos los que flotaban previo recuento.

Para la extracción del embrión se practicó una incisión en el tegumento por medio de un bisturí, con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se extrajo el embrión con una aguja y se determinó su estado por la forma y el tamaño.

Resultados

Por medio del análisis cariológico efectuado en ápices radiculares se determinó que todo el material estudiado posee 2n= 40 (Fig. 1).

El estudio de la meiosis fue realizado en diacinesis, ya que en metafase I, los bivalentes se encuentran aglutinados en la placa ecuatorial. En todas las células analizadas se observaron 20 bivalentes (Fig. 2). En algunas células se observó que los cromosomas de un bivalente se separaban en forma anticipada a los demás bivalentes. Todos los granos de polen tratados con carmín-glicerina se colorearon, estimándose por lo tanto un alto grado de fertilidad, cerca del 100%.

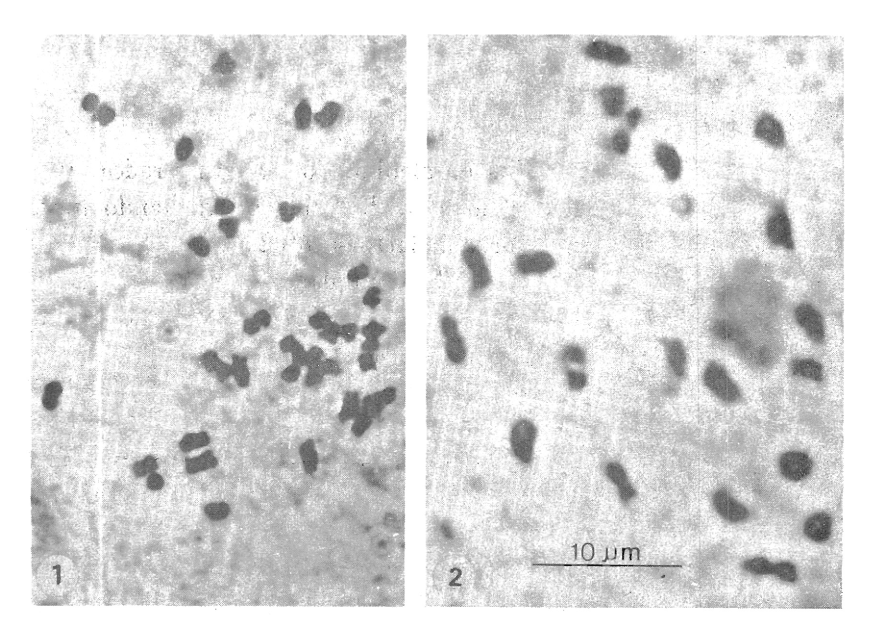


Fig. 1-2. 1-Cromosomas somáticos 2n=40; 2-Cromosomas meióticos, diacinesis con 20 II.

Los óvulos comienzan a formarse como mamelones en la parte superior del ovario que es tetralocular (Fig. 3). En la parte apical del óvulo y debajo del estrato subepidérmico se diferencia la célula arquesporial, rodeada por células que constituyen la nucela. En la base de la nucela aparece el tegumento que crece hasta cubrirla por completo. Al crecer el tegumento, se acentúa la curvatura concluyendo en un óvulo anátropo. El tegumento se desarrolla notablemente llenando todo el lóculo.

La meiosis de la célula arquesporial origina una tétrade lineal de megasporas, de las cuales sólo la del extremo calazal es funcional y las otras degeneran. La megaspora funcional, por tres divisiones mitóticas, origina el saco embrionario, el que a la madurez es 8–nucleado (Fig. 5 y 6). La capa exterior de la nucela está compuesta por células dispuestas ordenadamente. En la región calazal se encuentran células visiblemente diferenciadas del resto, se trata de la hipóstasis, constituida por células de sección poligonal de pared gruesa y citoplasma denso (Fig. 6).

Las antípodas son tres células grandes que se encuentran alojadas en el fondo del saco embrionario. Las sinérgidas tienen sus núcleos desplazados hacia la micrópila y degeneran una vez fecundada la oósfera, ésta generalmente presenta su núcleo desplazado hacia la calaza. Antes de la fecundación los dos núcleos polares se fusionan (Fig. 7).

Una vez que los frutos fueron desmenuzados y sometidos a reiterados lavados, las semillas que flotaban fueron recogidas por separado de las que permanecían sumergidas. Las semillas que flotaban en todos los casos se encontraban vacías. En el momento de efectuar los cortes de las semillas, se separaron aquellas que presentaban el endosperma ennegrecido por infección.

De 800 semillas analizadas, 270 flotaban (34%) y 528 permanecieron sumergidas (66%). De éstas, 63 estaban infectadas (7,87%) quedando 465 semillas sanas lo que representa el 58% en condiciones de germinar.

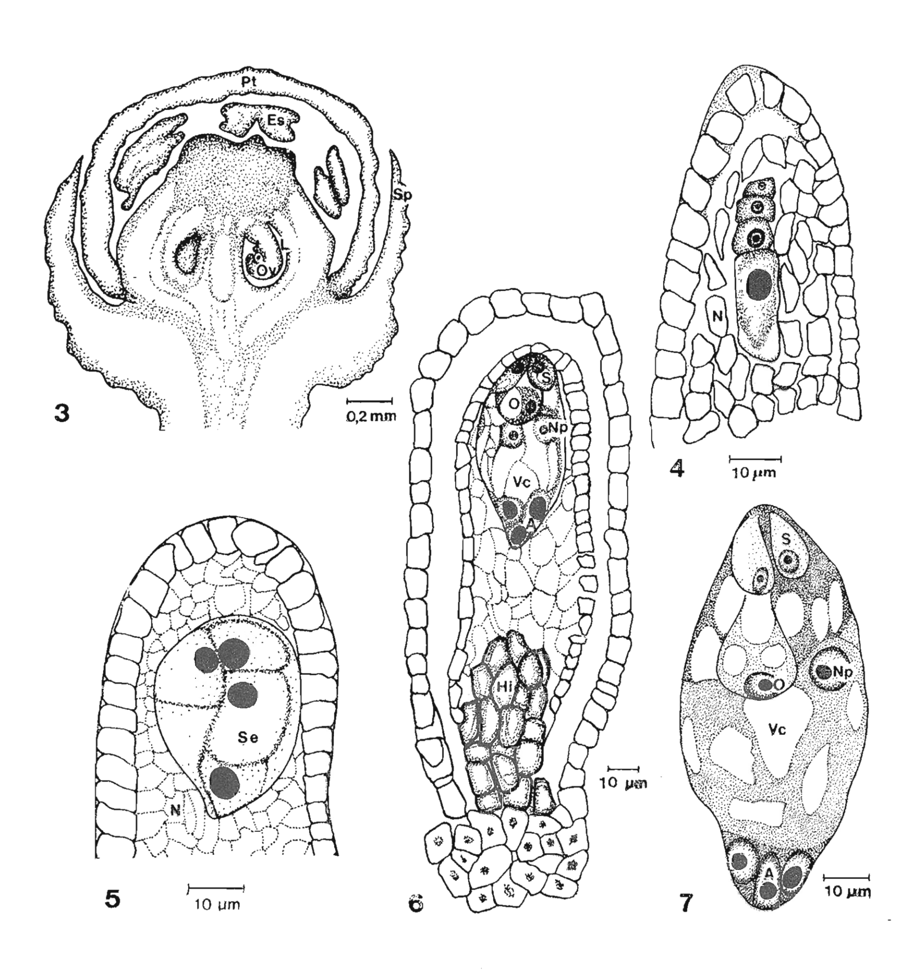


Fig. 3–7. Desarrollo del saco embrionario y formación del endosperma. 3–Corte longitudinal de un botón floral femenino previo a la antesis; 4– Tétrade de megasporas, las tres superiores degeneran; 5– Saco embrionario en estado de cuatro células; 6– Saco embrionario con ocho células; 7–Saco embrionario con los núcleos polares fusionados. (Pt: pétalos; Es: estaminodios; Sp: sépalos; L: lóculo; Ov: óvulo; N: nucela; Se: saco embrionario; O: oósfera; S: sinérgidas; Np: núcleos polares; Vc: vacuola; Hi: hipóstasis; A: antípodas).

Se midieron embriones provenientes de 521 semillas sanas, se observó que el 2,6% presentaba el embrión en estado globular con menos de 0,19 mm de longitud; el 70,24% en estado de corazón comprendido entre 0,20 a 0,29 mm (Fig. 8 y 12); un 23,62% en estado de post-corazón (Fig. 9) entre 0,30 a 0,40 mm y el 2,62% en estado de torpedo, entre 0,40 a 0,80 mm (fig. 10). Sólo el 0,96% presenta el embrión completamente desarrollado (maduro) con más de 1 mm de largo (Fig. 11). Además se encontró que el 1,2% de los pirenos eran biseminados (Fig. 13).

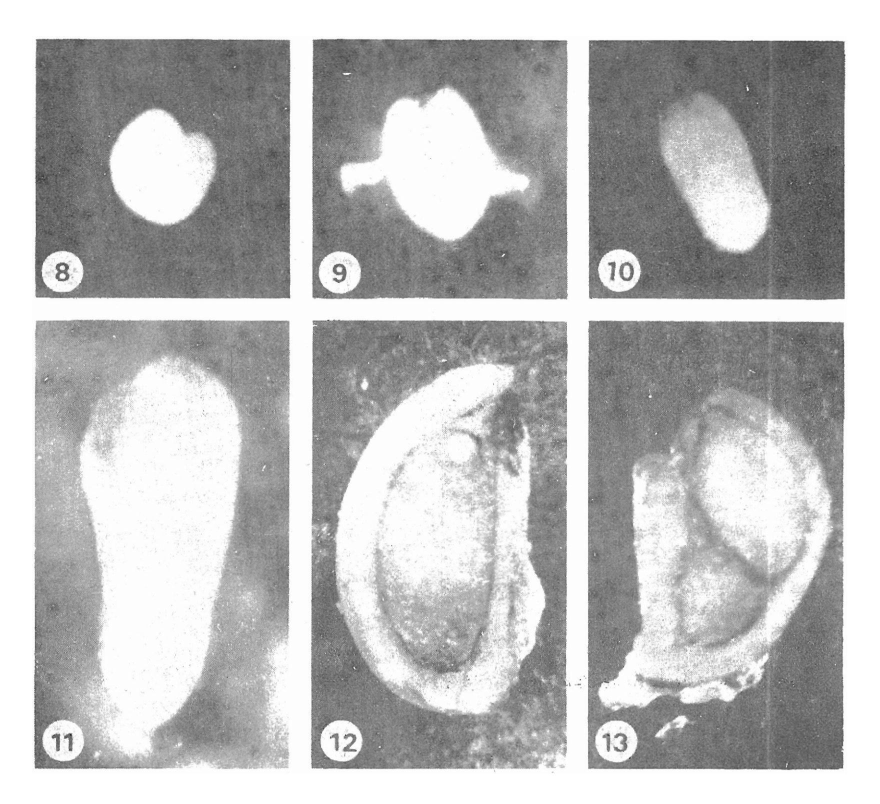


Fig. 8–13. Embriones en distinto estado de desarrollo. 8—estado de corazón; 9-post-corazón; 10—estado de torpedo; 11—embrión maduro; 12—Corte longitudinal de un pireno, nótese la ubicación del embrión en estado de corazón; 13-pireno con dos semillas. (8-11 x 50; 12-13 x 12,5).

En la figura 14 se presentan las medidas de los embriones en un histograma de frecuencia. La media aritmética es $\overline{X}= 0,294 \pm 0,004$. La clase con mayor frecuencia (22%) es la de 0,25 mm.

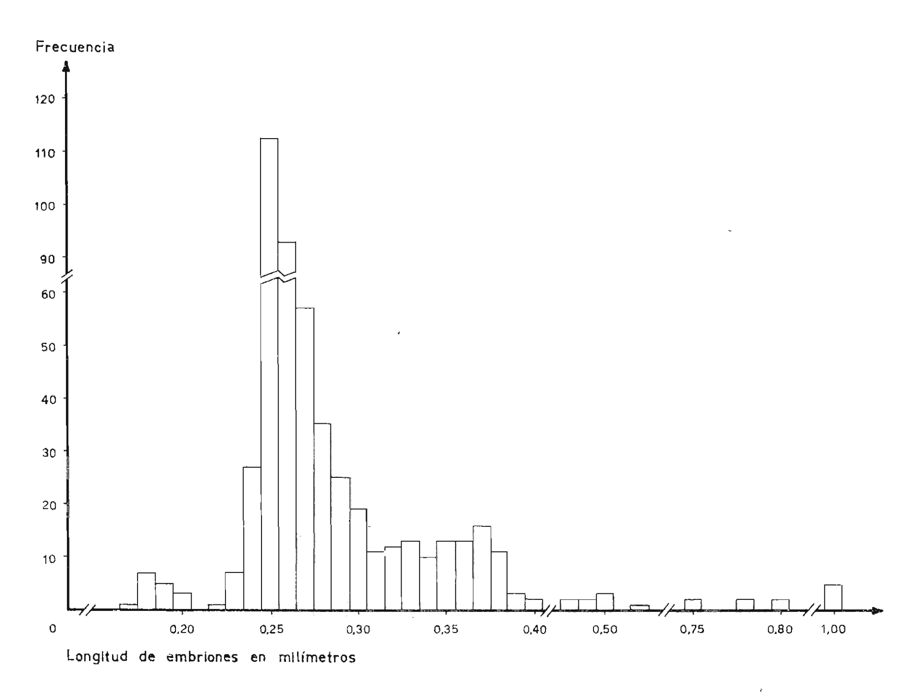


Fig. 14–Distribución de la frecuencia de los diferentes tamaños de embriones a la madurez del fruto.

Discusión

Los primeros estudios citológicos tendientes a establecer el número cromosómico de la Yerba Mate fueron realizados por Andrés y Saura en 1945, quienes determinaron 2n=40, lo que se confirma en este trabajo. El análisis de la meiosis coincide en cuanto al número y a la normalidad del proceso con los citados autores, quienes además observaron un par de cromosomas heteromórficos que se separaban antes que los otros, interpretado

como un par alosómico o sexual. En el presente trabajo también se ha observado un par que se separa precozmente pero no se observó diferencias de tamaño como para afirmar que se trata de un par sexual. La normalidad de la meiosis se refleja en la fertilidad del polen.

Si bien no se han observado todos los estados desde la célula arquesporial, hasta el saco embrionario maduro, se estaría en condiciones de afirmar que se trata de un saco tipo Polygonum (Maheshuari, 1950) como ya fue observado en otras especies de *Ilex* por Copeland (1963). En ninguno de los casos estudiados (25) se observaron sacos embrionarios abortados.

Copeland (1963) notó la presencia excepcional de un segundo óvulo abortado en un mismo lóculo en otras especies de *Ilex*, como así también observó dos células arquesporiales por óvulo. Giberti (1970) al describir el género *Ilex* menciona "pirenos uniseminados (rarísimo 2–seminados)". En el presente trabajo se ha encontrado 1,2% de pirenos biseminados.

Los datos de germinación obtenidos por Prat Kricum *et al.* (1985), en el INTA de Cerro Azul, pueden ser analizados en correspondencia al tamaño de los embriones. De aquí se deduce que el bajo porcentaje de germinación inicial corresponde al escaso porcentaje de embriones maduros (0,96%) que serían los primeros en germinar, seguidamente germinarían las semillas cuyos embriones se encuentran en estado de torpedo (2,65%), luego los que están en estado de post-corazón(23,62%). Seguidamente observamos que la curva de germinación sufre un acentuado incremento que correspondería al momento en que los embriones que se encuentran en estado de corazón (70,24%) han completado su desarrollo.

Los datos de Prat Kricum *et al.* (1985), indican que el promedio general de germinación es de 48% en los clones CA–1/74 y CA–61/76. Esto se relaciona, con los datos obtenidos en este trabajo, donde se encontró un 34% de semillas vacías más 7,87% de semillas infectadas, es decir que habría un 58% de semillas en condiciones de germinar.

Reitz *et al.* (1983), mencionan que el obstáculo que se presenta en la germinación de la semilla está dado por la dureza de su tegumento, de manera que se torna impermeable al agua. Respecto a la dureza del tegumento, si bien es de consistencia leñosa, presenta una interrupción que no dificulta la entrada de agua, esto también se demuestra en los ensayos de escarificación donde no se apreciaron diferencias con el testigo (Prat Kricum *et al.*, 1985).

Se ha demostrado en *Ilex opaca* Ait., que los embriones no maduros germinan, aunque mucho después que los maduros. A los embriones rudimentarios se les puede acelerar el desarrollo y la dormancia puede ser superada, mediante el cultivo *in vitro* (Hu, 1976). El mismo autor demostró que la luz influye negativamente en el desenvolvimiento de los embriones mantenidos *in vitro*. Estas experiencias han sido repetidas por Ferreira y Hu (1984) en *Ilex paraguariensis*, donde hallaron los mismos resultados.

Hu *et al.* (1979) determinaron que el escaso desarrollo de los embriones de *Ilex* se debe a sustancias inhibidoras presentes en el endosperma.

Este fenómeno de inactividad del embrión ha sido juzgado esencialmente como un fenómeno de dormancia y no como un carácter hereditario (Hu *et al.*, 1979). Los mismos autores creen que el crecimiento embrionario y la germinación son procesos de desarrollo continuos. El período de cesación del crecimiento ocurre en algún estado del desarrollo. En la mayoría de las especies, la cesación del crecimiento ocurre en la madurez de los embriones, dividiendo el desarrollo en: crecimiento y germinación. Durante el crecimiento, el embrión evoluciona desde cigota pasando por los estados de globular, corazón, torpedo y maduro, coincidiendo este último con el momento de la madurez del fruto. En cambio en *Ilex* el proceso se detiene en el estado de corazón, para continuar con los siguientes estadios una vez que la semilla ha sido puesta en condiciones de germinar.

Las conclusiones de Hu respecto a que los embriones comple-

tan su desarrollo y germinan por cultivo *in vitro*, cualquiera sea su estado, se corroboraron relacionando los datos de germinación de Prat Kricum *et al.* (1985) con el análisis de los distintos estados de desarrollo de los embriones realizado en el presente trabajo.

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento al Ing. Agr. Aveliano Fernández, por haber dirigido este trabajo. Al Ing. Agr. Antonio Krapovickas, Director del Instituto de Botánica del Nordeste por haber facilitado las instalaciones y la bibliografía. Al Coordinador Nacional de la Yerba Mate del INTA Ing. Agr. Sergio D. Prat Kricum, por la gentileza de haber brindado material e información sobre el tema. Al Ing. Agr. Luis A.Mroginski, titular de la cátedra de Fisiología Vegetal de F.C.A., UNNE. Al Sr. Víctor Maruñak por la confección de las figuras.

Bibliografía

Andres, J.M. y Saura, F. 1945. Los cromosomas de la Yerba Mate y otras especies del género *Ilex*. Publ. Inst. Genét. Fac. Agr. Vet. Buenos Aires. 2 (13): 161–168.

Brieux, J., Gómez Vara, M.E. y Avanza, J.R. 1982. Yerba Mate: La tecnología se inserta en una tradición secular. (Informe especial) QUID de la ciencia, la tecnología y la educación Argentina. 1 (7): 539–554.

Cabrera, A.C. 1976. Regiones Fitogeográficas Argentinas. Fasc. 1 Enc. Arg. de Agric. y Jard. 2° Edic. Tomo II ACME. Bs. As.

Fernández, A. 1973. El ácido láctico como fijador cromosómico. Bol. Soc. Argent. Bot. 15(2–3): 287–290.

Ferreira, A.G. y Hu, C.Y. 1984. Influência da luz na embriogénese tardía de *Ilex* – Culturas *in vitro*. Anais do XXXIV Congresso Nacional de Botânica. Vol. II Com. 441–449 Porto Alegre.

Giberti, C.G. 1970. Las especies argentinas del género *Ilex* L. *(Aquifoliaceae)*. Darwiniana 22 (1–3): 217–240.

Hu, C.Y. 1975. *In vitro* culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100 (3): 221–225.

—————— 1976. Light mediated inhibition of *in vitro* development of rudimentary embryos of *Ilex opaca* Ait. Amer. J. Bot. 63(5): 651–656.

Iritani, C. y Viana Soares, R. 1981. Acção de reguladores de crescimiento em estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Floresta 12 (2): 59–67.

Maheshwari, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw–Hill Book Company Inc. U.S.A.

Prat Kricum, S.D. 1983. Yerba Mate: Investigación agronómica en la República Argentina. INTA, EEA Misiones.

—————— ; Belingheri, L.D.; Piccolo, G.A.; Rivera Flores, S.E.; Swier, R. y Fontana, H.P. 1985. Yerba Mate: Informe sobre investigaciones realizadas en el período 1983–84. Miscelánea N°10 INTA, EEA Misiones.

Reitz, R.; Klein, R.M. y Reis, A. 1983. Proyecto madeira do Rio Grande do Sul. Sellowia 34–35: 284–292.